



Tumorspezifische, Hypoxie-basierte Aktivierung von EGFR-Inhibitoren**

Claudia Karnthaler-Benbakka, Diana Groza, Kushtrim Kryeziu, Verena Pichler, Alexander Roller, Walter Berger, Petra Heffeter* und Christian R. Kowol*

Abstract: Die Entwicklung von Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) ist ein Meilenstein in der Entwicklung neuer Tumortheraeutika. Allerdings geht die TKI-Therapie mit starken Nebenwirkungen und Chemotherapieresistenz einher. Ziel dieser Studie war die Synthese und präklinische Entwicklung eines neuen Inhibitors des Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR), der durch die spezifischen Eigenschaften des malignen Gewebes aktiviert wird. Zu diesem Zweck wurde ein Co^{III}-basiertes „Prodrug-Design“ verwendet, das die gezielte Freisetzung des aktiven EGFR-Inhibitors durch den im soliden Tumor auftretenden Sauerstoffmangel (Hypoxie) ermöglicht. Hierfür wurden mehrere neue EGFR-hemmende Liganden mit Chelateinheiten synthetisiert, und derjenige mit dem größten EGFR-hemmenden Potenzial wurde für die Komplexierung mit Co^{III} ausgewählt. Anschließend wurden hypoxische Aktivierung und Hemmung des EGFR-Signalwegs nachgewiesen, und eine vielversprechende Aktivität des neuen Komplexes in vivo wurde gezeigt.

Tyrosinkinasen spielen eine bedeutende Rolle bei der Signaltransduktion und Regulation diverser intrazellulärer Prozesse, wie Zellteilung und -differenzierung. Aufgrund dieser zentralen Aufgaben sind die Mutation und Fehlregulierung diverser Tyrosinkinasen bekanntermaßen wesentlich an der Entartung von Krebszellen beteiligt.^[1] Eines der bekanntesten Beispiele hierfür ist der Epidermale Wachstums-

faktorrezeptor (EGFR, erbB1), eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die bei einer Vielzahl von Krebserkrankungen, z. B. Lungen-, Darm-, Eierstock- oder Brustkrebs, überexprimiert und mit einer besonders schlechten Prognose verbunden ist.^[2] Dies machte den EGFR zu einem besonders wichtigen Ziel in der Krebstherapie und führte folglich zur Entwicklung einer großen Zahl von EGFR-Inhibitoren. Zu den potentesten EGFR-TKIs gehören Vertreter der 4-Anilinochinazoline,^[3] von denen Gefitinib (Iressa) und Erlotinib (Tarceva) als erste ihrer Klasse eine Arzneimittelzulassung erhielten (Abbildung 1). Seit 2003 bzw. 2004 werden diese beiden Verbin-

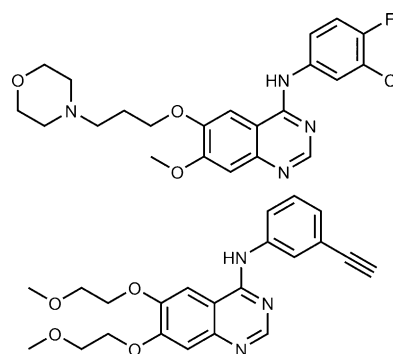


Abbildung 1. Chemische Strukturen von Gefitinib (Iressa; oben) und Erlotinib (Tarceva; unten).

[*] M. Sc. C. Karnthaler-Benbakka,^[†] Dr. V. Pichler, Dipl.-Ing. A. Roller, Dr. C. R. Kowol
Institut für Anorganische Chemie, Universität Wien
Währinger Straße 42, 1090 Wien (Österreich)
E-Mail: christian.kowol@univie.ac.at

M. Sc. D. Groza,^[†] Mag. K. Kryeziu, Prof. Dr. W. Berger, Dr. P. Heffeter
Institut für Krebsforschung
Medizinische Universität Wien
Borschkegasse 8A, 1090 Wien (Österreich)
E-Mail: petra.heffeter@meduniwien.ac.at

Prof. Dr. W. Berger, Dr. P. Heffeter, Dr. C. R. Kowol
Forschungsplattform „Translational Cancer Therapy Research“, Universität Wien und Medizinische Universität Wien
Wien (Österreich)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Stadt Wien für innovative interdisziplinäre Krebsforschung, die FWF (P26603), COST Aktion CM1105 und dem österreichischen Wissenschaftsfonds [Projekt P26603] unterstützt. Wir danken Prof. Walter Weissensteiner (Universität Wien) für hilfreiche Diskussionen. Die Autoren erklären einen Interessenkonflikt, da die Hauptverbindung patentiert wurde.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201403936> zu finden.

dungen in der klinischen Behandlung von lokal-invasivem bzw. metastasierendem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) mit aktivierenden EGFR-Mutationen eingesetzt.^[2] Zusätzlich wurde Erlotinib für die Behandlung von metastasierendem Pankreaskarzinom in Kombination mit Gemcitabin zugelassen.^[4] Zu den größten Problemen der TKIs zählen allerdings, abgesehen von der Resistenzentwicklung, die unzureichende Anreicherung des Medikaments im soliden Tumor sowie das Auftreten schwerer Nebenwirkungen, wie des papulopustulösen Exanthems („rash“).^[5]

Ein vielversprechender Ansatz für die Reduktion therapiebegleitender Nebenwirkungen ist die Erhöhung der Tumorselektivität durch diverse Prodrug-Systeme. Diese Ansätze beruhen auf der Entwicklung biologisch inaktiver Substanzen, die erst durch das spezifische Milieu des soliden Tumors aktiviert werden.^[6] Hierfür gibt es verschiedenste Strategien, wovon einer der Interessantesten auf der Aktivierung der Substanzen durch Reduktion im (für die meisten soliden Tumoren charakteristischen) hypoxischen Milieu beruht.^[7] Dies ist besonders vielversprechend, da gerade hypoxische Tumoren für eine hohe Chemotherapieresistenz und schlechte Prognose bekannt sind.^[8]

Cobalt(III)-Verbindungen können als solche bioreduzierbaren Prodrugs verwendet werden, da bei diesen das Co^{III} / Co^{II} -Redoxpotenzial spezifisch für den Bereich zellulärer Reduktionsmittel designt werden kann^[8,9] und es in den unterschiedlichen Oxidationsstufen signifikante Unterschiede in der Stabilität der Ligandenbindung gibt.^[10] Während oktaedrische d^6 -Low-Spin- Co^{III} -Komplexe kinetisch inert sind, zeichnen sich die durch Reduktion gebildeten d^7 -High-Spin-Komplexe durch kinetische Labilität aus.^[9a] Daher erfolgt in der Abwesenheit von Sauerstoff (der zur augenblicklichen Rückoxidation führen würde) ein Ligandenaustausch im Co^{II} -Komplex, der zur gezielten Freisetzung der biologisch aktiven Liganden genutzt werden kann (Abbildung 2).^[10] Dieses

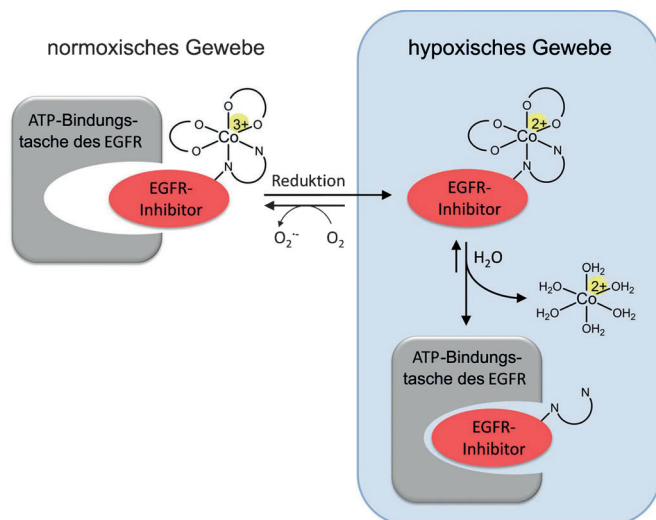
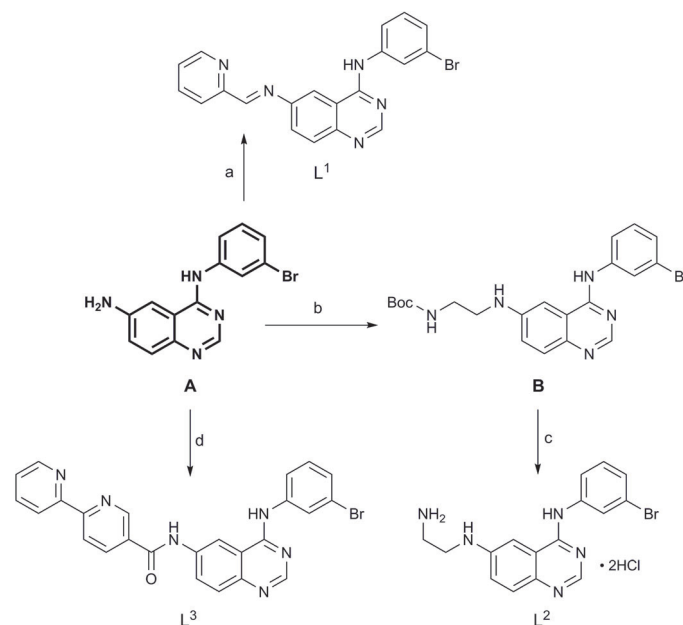


Abbildung 2. Schematische Übersicht über das TKI- Co^{III} -Prodrug-Konzept.

Konzept wurde bereits für einige zytotoxische Verbindungen wie Senfgase^[9a] oder DNA-Interkalatoren verwendet.^[11] Allerdings gab es trotz der Nebenwirkungsproblematik für die große Klasse der TKIs bis heute kaum Ansätze, Nebenwirkungen durch ein chemisches Prodrug-Design zu reduzieren.^[12] Das Ziel der hier präsentierten Arbeit war daher, mithilfe von Co^{III} -Komplexen neue EGFR-Inhibitoren zu entwickeln, die selektiv im hypoxischen Milieu des soliden Tumors aktiviert werden. Diese Prodrug-Strategie beruht auf der Annahme, dass die intakten Komplexe zu groß für eine effiziente Bindung an die ATP-Bindungsstelle des EGFR und dadurch nicht in der Lage sind, die Aktivität der Kinase zu hemmen. Erst durch die Reduktion im hypoxischen Milieu des malignen Gewebes kommt es zur lokalen Freisetzung des aktiven Liganden (Abbildung 2), wodurch die systemische Toxizität, wie sie etwa besonders in der Haut auftritt, reduziert werden soll.

Wie aus der Literatur bekannt, zeigen Co^{III} -Komplexe mit einzähligen Liganden keine ausreichende Selektivität für hypoxische Zellen.^[9a] Daher wurde hier der Fokus auf die Synthese potenzieller EGFR-Inhibitoren mit zweizähligen Chelateinheiten gelegt. Als Grundgerüst wurde die 4-Anilinochinazolineneinheit des präklinisch untersuchten Inhibitors EKI-785 (CL-387,785)^[13] verwendet, die eine für chemische

Modifikationen leicht zugängliche Aminogruppe in Position 6 des Chinazolinrings trägt. Als zweizählige Einheiten wurden 2-Pyridinmethanimin (L^1), Ethylendiamin (L^2) und 2,2'-Bipyridin (L^3) ausgewählt (Schema 1). Bei diesen Strukturen wurde auf unterschiedliche Größe und elektronische Eigenschaften geachtet, um deren Einfluss auf die Rezeptorbindungseigenschaften zu untersuchen.



Schema 1. Synthese von L^1 , L^2 und L^3 . Reaktionsbedingungen: a) Pyridin-2-carboxaldehyd, MeOH, Rückfluss, 94%; b) *N*-Boc-2-aminoacetaldehyd, abs. MeOH, HOAc, Molekularsieb (3–4 Å), dann NaBH_3CN , 85%; c) konz. HCl, EtOH, Rückfluss, 82%; d) 2,2'-Bipyridin-5-carbonsäure, HOBT-H₂O, TBTU, DIPEA, DMF, 60%. Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, DIPEA = *N,N*-Diisopropylethylamin, HOBT = 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol, TBTU = *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumtetrafluoroborat.

Die Grundstruktur **A** wurde durch eine dreistufige Synthese nach Tsou et al. hergestellt.^[14] Für die Synthese von L^1 wurde eine literaturbekannte Methode modifiziert^[15] und **A** mit einem Überschuss Pyridin-2-carboxaldehyd in siedendem Methanol in 94% Ausbeute umgesetzt. L^2 wurde durch direkte reduktive Aminierung von *N*-Boc-2-aminoacetaldehyd und **A** mit Natriumcyanoborhydrid unter schwach sauren Bedingungen und anschließendem Entschützen mit Salzsäure in einer Gesamtausbeute von 70% synthetisiert. Für die Synthese von L^3 wurden **A** und 2,2'-Bipyridin-5-carbonsäure mit HOBT/TBTU in DMF gekuppelt.

Um zu überprüfen, ob die neu eingefügten Gruppen einen negativen Einfluss auf die Hemmung des EGFR-Proteins haben, wurde die Wirksamkeit der neuen Verbindungen mit der von Erlotinib verglichen. Zum einen wurde hierfür die Aktivität gegen die bekannten Erlotinib-empfindlichen Zelllinien A431 und Calu3 (beide EGFR-Wildtyp) sowie die Erlotinib-resistenten H1975-Zellen (mit der resistenzvermittelnden EGFR-Mutation T790M) untersucht. Zum anderen wurde die direkte Inhibierung der Kinaseaktivität zellfrei am isolierten Enzym bestimmt (Tabelle 1 und Abbildung S1, S:

Tabelle 1: Antiproliferative Aktivität (72 h) und EGFR-inhibierendes Potenzial.

Substanz	Inhibierung des Zellwachstums [IC ₅₀ μM]			EGFR-Inhibierung [IC ₅₀ , nM]
	A431	Calu3	H1975	
Erlotinib	2.6 ± 0.8	0.74 ± 0.02	> 25	2 ^[17]
L ¹	> 25	3.5 ± 0.1	20 ± 4	1.34
L ²	9.2 ± 0.5	2.0 ± 0.5	15 ± 2	0.95
L ³	> 25	> 25	> 25	4.59

Hintergrundinformationen). In allen Untersuchungen zeigte sich, dass die Verbindung mit der Bipyridyleinheit L³ die niedrigste EGFR-hemmende Aktivität mit IC₅₀-Werten weit über 25 μM hatte. Auch die 2-Pyridinmethanimineinheit in L¹ verminderte die Wirksamkeit gegenüber der von Erlotinib besonders in A431-Zellen. Einzig in Calu3-Zellen wurde eine Aktivität im niedrigen μM Bereich beobachtet. Im Unterschied dazu zeigte L², das die kleinste Chelateinheit trägt, sowohl in den Erlotinib-resistenten als auch in den empfindlichen Modellen IC₅₀-Werte im niedrigen μM Bereich. Dies korrelierte auch mit dem höchsten Inhibierungspotenzial gegen die zellfreie Kinase.

Um zu überprüfen, ob die beobachteten zytotoxischen Effekte tatsächlich auf der Hemmung des EGFR-Signalweges beruhen, wurde der Einfluss von L² auf die EGF-stimulierte Aktivierung des EGFR und seines Zielproteins ERK1/2 mithilfe eines Westernblots untersucht. Wie Abbildung 3 zeigt, konnte nach 4 h Inkubation eine deutliche dosisabhängige Hemmung der EGFR- und ERK1/2-Phosphorylierung beobachtet werden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde L² für die folgende Komplexbildung an Co^{III} ausgewählt.

Für die Komplexbildung von L² wurde Na[Co(acac)₂(NO₂)₂] (**D**; acac = Acetylacetonat) als Co^{III}-Vorstufe verwendet. Dieser Komplex hatte in früheren Studien einen guten und relativ raschen Austausch der beiden Nitrogruppen mit N,N-chelatisierenden Liganden gezeigt.^[9a,16] Für die Synthese von **D** wurde Natriumhexanitrocobaltat(III) (**C**) mit einer wässrigen Lösung aus Acetylaceton und Natriumhydroxid umgesetzt.^[18] Die Co^{III}-Komplexe von L² wurden, ähnlich der Methode von Ware et al.,^[9a] in Gegenwart von Aktivkohle in einem Wasser/Methanol-Gemisch synthetisiert (Abbildung 4 A). Komplex **1a** wurde durch Ausfällen mit

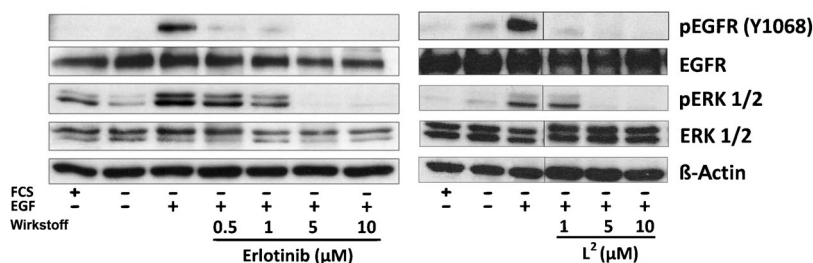


Abbildung 3. Hemmung des EGFR-Signalweges durch L² und Erlotinib. A431-Zellen wurden in Medium mit (+) und ohne Serum (–) kultiviert und anschließend 4 h mit den genannten Substanzen behandelt. Nach 15 min EGFR-Stimulation mit 50 ng mL^{–1} EGF wurden die Zellen geerntet und lysiert, und die Aktivierung des EGFR-Signalweges (pERK, pEGFR) wurde durch einen Westernblot analysiert.

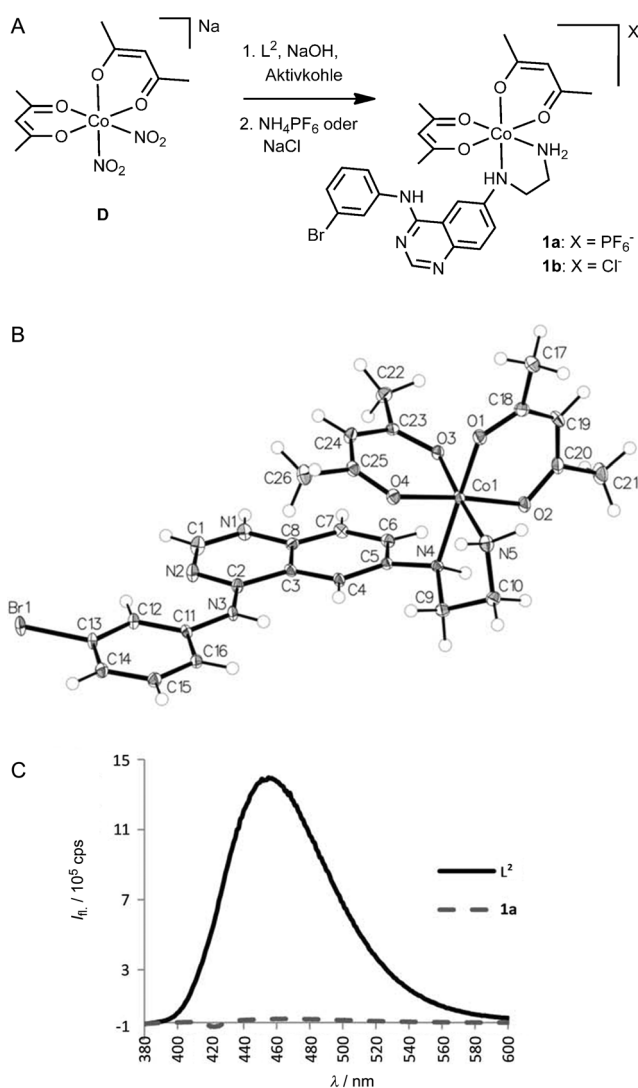


Abbildung 4. A) Synthese der Komplexe **1a** und **1b**. B) Kristallstruktur von [1·HClO₄]ClO₄ (Darstellung ohne Gegenionen). C) Fluoreszenz-emissionsspektrum von 30 μM Lösungen von L² und **1a** in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung.

Ammoniumhexafluorophosphat und anschließende Aufreinigung mit Umkehrphasen-HPLC erhalten. Das ¹H-NMR-Spektrum von **1a** (Abbildung S2) zeigt zwei Signalsets. Dies begründet sich mit dem Vorhandensein zweier Diastereomerenpaare, die durch die Propellerchiralität des Komplexes und das neu gebildete stereogene Zentrum an der Aminogruppe der Ethylendiamineinheit gebildet werden. Durch langsame Kristallisation mit Natriumperchlorat im sauren Milieu wurde, wie durch Kristallstrukturanalyse gezeigt, nur ein Isomer des protonierten Perchloratsalzes [1·HClO₄]ClO₄ (Abbildung 4 B) erhalten.^[19] Nach Auflösen der Einkristalle interkonvertierte dieses mit der Zeit jedoch wieder, was zur erneuten Bildung zweier Signalsets im ¹H-NMR-Spektrum führte. Somit wäre die Isolierung der reinen Diastereomere nicht mög-

lich. Bemerkenswerterweise zeigt der metallfreie Ligand L^2 nach Anregung bei $\lambda = 370$ nm eine intrinsische Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum bei $\lambda = 455$ nm, die nach Komplexierung in Komplex **1a** vollständig ausgelöscht wird (Abbildung 4C). Diese Eigenschaft ermöglichte Stabilitätsuntersuchungen mittels Fluoreszenzspektroskopie von **1a** in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), die keine signifikante Freisetzung des Liganden L^2 über 24 h zeigen. Zusätzlich wurde die Hypoxie-vermittelte Ligandenfreisetzung von **1a** fluoreszenzmikroskopisch belegt.

Abbildung 5 zeigt die starke intrazelluläre Fluoreszenz von L^2 unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen, während die Fluoreszenz in mit **1a** behandelten Zellen in der Normoxie stark reduziert ist und auf einen intakten Co^{III} -Komplex schließen lässt. Unter hypoxischen Bedingungen nahm die Fluoreszenz in mit **1a** behandelten Zellen dagegen stark zu, gleichbedeutend mit einer Aktivierung der Prodrug mit anschließender Ligandenfreisetzung.

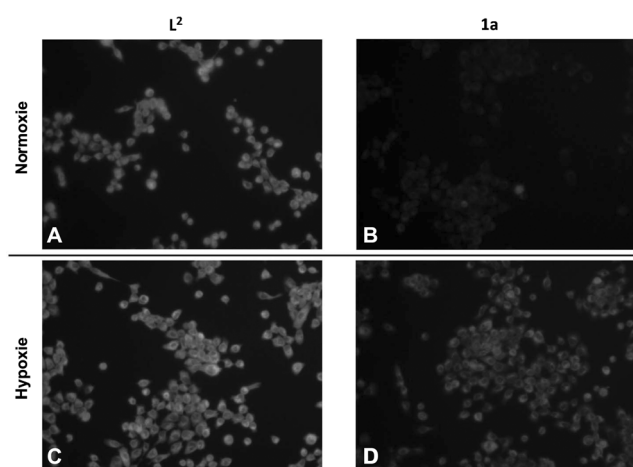


Abbildung 5. UV-Fluoreszenzmikroskopie der Ligandenfreisetzung von **1a** nach hypoxischer Aktivierung im Vergleich zu L^2 . A431-Zellen wurden mit $10 \mu M$ L^2 (A und C) und **1a** (B und D) unter normoxischen (A und B) und hypoxischen (C und D) Bedingungen 6 h inkubiert.

Im Anschluss wurde die Aktivität des neuen Co^{III} -Komplexes gegen Krebszellen im Vergleich zum metallfreien Liganden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen getestet (Abbildung 6 sowie Abbildungen S3 und S4A). **1a** war (bis zur höchsten Testkonzentration von $25 \mu M$) weitgehend inaktiv unter Normoxie, während die Aktivität unter Hypoxie stark erhöht wurde. Wie erwartet wurde die starke Wirksamkeit von L^2 nur geringfügig durch die variierenden Sauerstoffbedingungen beeinflusst. Weiterführende Versuche zeigten, dass analoge Co^{III} -Komplexe ohne EGFR-inhibierenden Liganden ($[Co^{II}(acac)_2en]$ ($en = Ethylendiamin$) und $[Co^{III}(acac)_2en]PF_6$) keinerlei Zytotoxizität aufweisen (Abbildung S4B). Somit konnte ein Einfluss des Cobaltzentrums auf die Zytotoxizität ausgeschlossen werden.

In guter Übereinstimmung mit diesen Versuchen waren auch Westernblotanalysen, die unter Normoxie eine stark reduzierte EGFR-hemmende Wirksamkeit von **1a** belegen, während unter Hypoxie eine ähnliche Aktivität wie bei dem freien Liganden L^2 zu sehen war (Abbildungen 7 und S5).

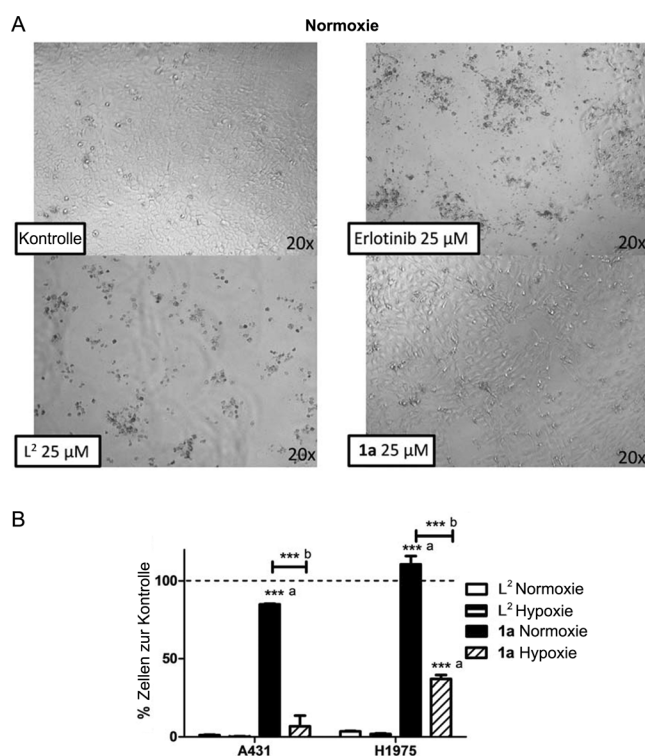


Abbildung 6. Einfluss von Hypoxie auf die Wirksamkeit von Erlotinib, L^2 und **1a**. A) A431-Zellen wurden unter Normoxie 72 h mit L^2 , **1a** oder Erlotinib behandelt. B) A431 (EGFR-überexprimierend) und H1975 (Überexpression von EGFR mit einer aktivierenden L858R und einer sekundären Erlotinibresistenz-vermittelnden T790M-Mutation) wurden 72 h mit $25 \mu M$ L^2 oder **1a** unter Normoxie oder Hypoxie behandelt. Die Menge der lebenden Zellen wurde mithilfe eines MTT-Assays bestimmt. Die angegebenen Werte sind der Mittelwert \pm Standardabweichung eines repräsentativen Experiments (dreifach wiederholt). Statistische Auswertung durch: t-test; *** $p < 0.001$; a: Unterschied zwischen L^2 und **1a**; b: Unterschied zwischen **1a** Normoxie und **1a** Hypoxie.

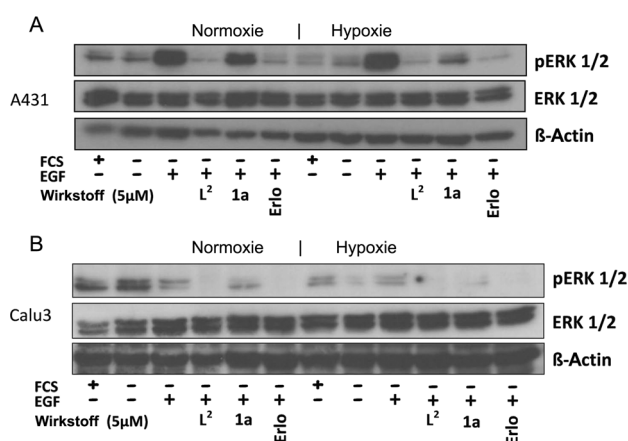


Abbildung 7. Einfluss der Hypoxie auf die Inhibition des EGFR-Signalwegs durch L^2 , **1a** und Erlotinib (Ero). A) A431- und B) Calu3-Zellen wurden in Medium mit (+) und ohne Serum (-) kultiviert und anschließend 4 h mit $5 \mu M$ der angegebenen Substanzen behandelt. Nach 15 min EGFR-Stimulation mit 50 ng mL^{-1} EGF wurden die Zellen geerntet und lysiert, und die Aktivierung des EGFR-Signalwegs (pERK) wurde durch einen Westernblot analysiert. Die dazugehörigen EGFR-Banden sind in Abbildung S5A gezeigt.

Zusammen zeigen diese Experimente, dass die Koordination von L^2 an Co^{III} die Rezeptorbindung und EGFR-Inhibierung sehr effektiv verhindert, wohingegen Hypoxie zur Freisetzung des Liganden und folglich zu hoher Aktivität gegen EGFR-abhängige Krebszellen *in vitro* führt.

Somit wurden im nächsten Schritt die Verträglichkeit und Aktivität der neuen Verbindung in EGFR-abhängigen Xenograftmodellen in SCID-Mäusen getestet. Zu diesem Zweck wurde das besser wasserlösliche Chloridsalz **1b** durch Komplexfällung mit einer gesättigten Kochsalzlösung und anschließende Reinigung mittels Umkehrphasen-HPLC hergestellt (Abbildung 4 A; die vergleichbare Aktivität von **1a** mit **1b** wurde in Zellkulturexperimenten überprüft). Die Behandlung der Mäuse mit **1b** war sowohl bei wiederholter intraperitonealer (i.p.-) als auch intravenöser (i.v.-) Gabe über die Schwanzvene gut verträglich. Bezüglich der tumorhemmenden Wirkung zeigte **1b** potente und mit Erlotinib vergleichbare Aktivität gegen das A431-Xenograftmodell (besonders bei i.p.-Verabreichung; Abbildung 8). Hervorzuheben sind allerdings die Befunde im Calu3-Xenograftmodell, wo **1b** zu einem deutlichen Schrumpfen der Tumoren führte, sobald diese eine Größe über 200 mm^3 erreichten. Im Unterschied dazu bildete sich im Laufe des Versuches in den Erlotinib-Gruppen eine vollständige Therapieresistenz heraus (Abbildung 8D). Die Befunde in diesem Xenograftmodell sind von besonderem Interesse, da sich Calu3-Tumoren durch eine spezielle Histologie mit relativ kleinen, von Mäusefibroblasten umschlossenen Tumorinseln auszeichnen (Abbildung 8E,F). Dadurch ist zu erwarten, dass Calu3-Tumoren erst ab einem deutlich größeren Tumolvolumen hypoxische Bereiche entwickeln, in denen **1b** aktiviert werden kann. Dies ist unseres Wissens der erste Nachweis für die hypoxische Aktivierbarkeit von Co^{III} -Komplexen *in vivo*.

Zusammenfassend gehört das Auftreten von schweren Nebenwirkungen (z.B. des papulopustulösen Exanthems) zu den größten Problemen bei der Behandlung von Krebspatienten mit EGFR-Inhibitoren. Dadurch ergibt sich der akute Bedarf der Entwicklung neuer Derivate, die nur im malignen Gewebe aktiv sind. Die Nutzung von tumorspezifischer Hypoxie bietet eine der vielversprechendsten Strategien zum Erreichen dieses Zieles.^[7] Dies ist darüber hinaus von besonderem Interesse, da gerade hypoxische Tumoren für ihre häufige Chemotherapieresistenz und ihre schlechte Prognose bekannt sind.^[7c,20]

Durch dieses Wissen inspiriert gab es bereits mehrere Ansätze, Hypoxie-aktivierbare zytotoxische Verbindungen zu entwickeln, von denen einige bereits erfolgreich in Phase-II- und Phase-III-Studien klinisch getestet werden.^[7b] Die hier präsentierte Studie stellt allerdings den ersten Ansatz einer solchen Aktivierungsstrategie für Tyrosinkinase-Inhibitoren dar, die unter Verwendung eines Co^{III} -Prodrug-Designs realisiert wurde. Hierfür wurde ein neuer EGFR-Inhibitor mit

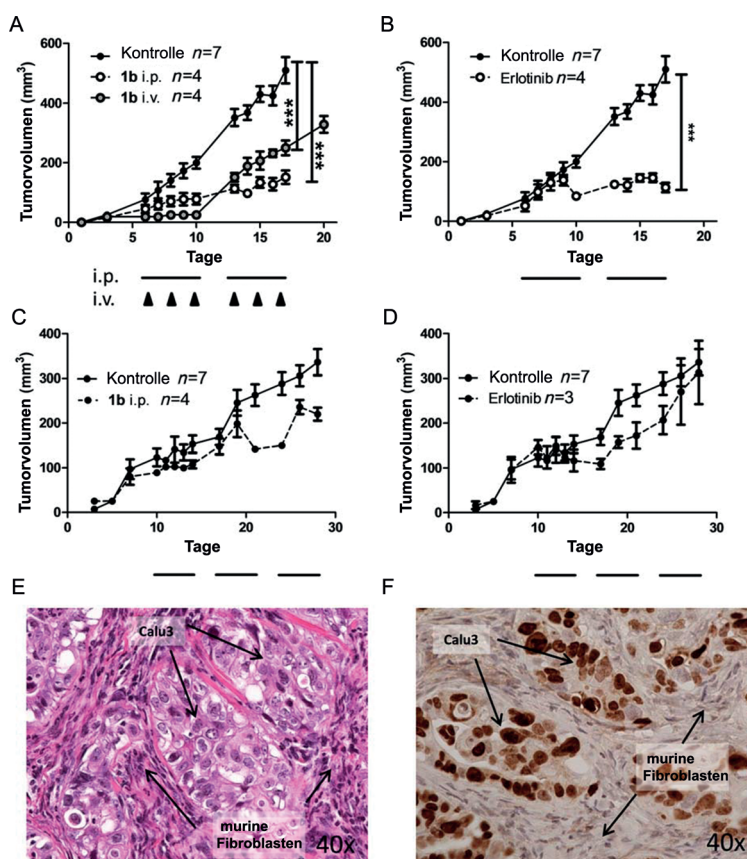


Abbildung 8. In-vivo-Aktivität von **1b** und Erlotinib in Xenograftmodellen mit humanen Krebszellen. A, B) A431- und C, D) Calu3-Zellen wurden subkutan in die rechte Flanke von CB-17/SCID-Mäusen injiziert. Nach Bildung eines tastbaren Tumors wurde **1b** wie angegeben verabreicht. Als Dosis wurden 5 mg kg^{-1} für i.v.- und 25 mg kg^{-1} für i.p.-Experimente verabreicht. Erlotinib wurde mit 25 mg kg^{-1} oral gegeben. i.p.- und orale Therapiezyklen über fünf aufeinanderfolgende Tage sind durch einen schwarzen Strich dargestellt. Die Tage der i.v.-Behandlung sind durch schwarze Pfeile (▲) gekennzeichnet. Die Tumorgößen wurden wie in den Hintergrundinformationen angegeben berechnet. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Verwendeter statistischer Test: two-way ANOVA ($*** p < 0.001$). Am letzten Versuchstag wurden die Tumoren entnommen und histologisch aufgearbeitet. Die Gewebemorphologie von unbehandelten Calu3-Tumoren wurde mit E) H&E-Färbung und F) immunhistochemischem Nachweis von humanem Ki67 untersucht.

einer zweizähligen Chelateinheit synthetisiert, und es wurde nachgewiesen, dass der Co^{III} -Komplex starke Hypoxie-abhängige Wirksamkeit sowohl in Zellkulturexperimenten als auch in Xenograftmodellen *in vivo* aufweist. Unsere Studie zeigt somit, dass Hypoxie-aktivierbare Prodrugsysteme eine vielversprechende Strategie zur Verbesserung der Therapie mit EGFR-Inhibitoren darstellen.

Eingegangen am 2. April 2014
Online veröffentlicht am 30. Juli 2014

Stichwörter: Cobalt · Hypoxie · Tumortheraeutika · Prodrugs · Tyrosinkinase-Inhibitor

- [1] M. K. Paul, A. K. Mukhopadhyay, *Int. J. Med. Sci.* **2004**, *1*, 101–115.
- [2] S. V. Sharma, D. W. Bell, J. Settleman, D. A. Haber, *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 169–181.
- [3] V. Chandregowda, A. K. Kush, G. C. Reddy, *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3046–3055.
- [4] C. M. Rocha-Lima, H. P. Soares, L. E. Razez, R. Singal, *Cancer Control* **2007**, *14*, 295–304.
- [5] a) G. Lurje, H. J. Lenz, *Oncology* **2009**, *77*, 400–410; b) T. Li, R. Perez-Soler, *Targ. Oncol.* **2009**, *4*, 107–119.
- [6] I. Tranoy-Opalinski, A. Fernandes, M. Thomas, J. P. Gesson, S. Papot, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2008**, *8*, 618–637.
- [7] a) M. A. Naylor, P. Thomson, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2001**, *1*, 17–29; b) W. R. Wilson, M. P. Hay, *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 393–410; c) J. M. Brown, W. R. William, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 437–447.
- [8] I. Ott, R. Gust, *Arch. Pharm.* **2007**, *340*, 117–126.
- [9] a) D. C. Ware, B. D. Palmer, W. R. Wilson, W. A. Denny, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1839–1846; b) U. Jungwirth, C. R. Kowol, B. K. Keppler, C. G. Hartinger, W. Berger, P. Heffeter, *Antioxid. Redox Signaling* **2011**, *15*, 1085–1127.
- [10] M. C. Heffern, N. Yamamoto, R. J. Holbrook, A. L. Eckermann, T. J. Meade, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 189–196.
- [11] a) G. O. Ahn, K. J. Botting, A. V. Patterson, D. C. Ware, M. Tercel, W. R. Wilson, *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 1683–1694; b) J. Y. C. Chang, R. J. Stevenson, G. L. Lu, P. J. Brothers, G. R. Clark, W. A. Denny, D. C. Ware, *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 11535–11550; c) J. B. Milbank, R. J. Stevenson, D. C. Ware, J. Y. C. Chang, M. Tercel, G. O. Ahn, W. R. Wilson, W. A. Denny, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6822–6834.
- [12] D. Baiz, T. A. Pinder, S. Hassan, Y. Karpova, F. Salsbury, M. E. Welker, G. Kulik, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8038–8046.
- [13] a) C. M. Discafani, M. L. Carroll, M. B. Floyd, Jr., I. J. Hollander, Z. Husain, B. D. Johnson, D. Kitchen, M. K. May, M. S. Malo, A. A. Minnick, Jr., R. Nilakantan, R. Shen, Y. F. Wang, A. Wissner, L. M. Greenberger, *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *57*, 917–925; b) T. Barf, A. Kaptein, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6243–6262.
- [14] H. R. Tsou, N. Mamuya, B. D. Johnson, M. F. Reich, B. C. Gruber, F. Ye, R. Nilakantan, R. Shen, C. Discafani, R. DeBlanc, R. Davis, F. E. Koehn, L. M. Greenberger, Y. F. Wang, A. Wissner, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2719–2734.
- [15] A. Bourkoulas, M. Paravatou-Petsotas, A. Papadopoulos, I. Santos, H. J. Pietzsch, E. Livaniou, M. Pelecanou, M. Papadopoulos, I. Pirmettis, *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4021–4027.
- [16] R. D. Archer, B. P. Cotsoradis, *Inorg. Chem.* **1965**, *4*, 1584–1589.
- [17] J. D. Moyer, E. G. Barbacci, K. K. Iwata, L. Arnold, B. Boman, A. Cunningham, C. DiOrio, J. Doty, M. J. Morin, M. P. Moyer, M. Neveu, V. A. Pollack, L. R. Pustilnik, M. M. Reynolds, D. Sloan, A. Theleman, P. Miller, *Cancer Res.* **1997**, *57*, 4838–4848.
- [18] L. J. Boucher, J. C. Bailar, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1965**, *27*, 1093–1099.
- [19] Kristalldaten für $[1\text{-HClO}_4]\text{ClO}_4$: $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{BrCl}_2\text{CoN}_5\text{O}_{12}$, $M_r = 815.30$, Kristallgröße = $0.040 \times 0.049 \times 0.312 \text{ mm}^3$, triklin, $P1$, $a = 7.7893(4)$, $b = 12.3702(7)$, $c = 16.7844(9) \text{ \AA}$, $\alpha = 82.404(2)$, $\beta = 78.264(2)$, $\gamma = 76.685(2)^\circ$, $V = 1534.70(14) \text{ \AA}^3$, $Z = 2$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.764 \text{ g cm}^{-3}$, $\mu = 2.108 \text{ mm}^{-1}$, $\lambda(\text{Mo-K}\alpha) = 0.71073 \text{ \AA}$, $T = 100 \text{ K}$, $2\theta_{\text{max}} = 60.29^\circ$, 58928 gemessene Reflexionen, 9022 unabhängige ($R_{\text{int}} = 0.0552$), $R_1 = 0.0500$, $wR_2 = 0.1269$, maximaler Elektronenüberschuss/-mangel: 1.084 and $-0.702 \text{ e \AA}^{-3}$. CCDC 994541 enthält die ausführlichen kristallographischen Daten zu dieser Veröffentlichung. Die Daten sind kostenlos beim Cambridge Crystallographic Data Centre über www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif erhältlich.
- [20] Y. Wang, M. Ohh, *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, *14*, 496–503.